

Разработка и валидация методики количественного определения метотрексата в транспортной среде методом ВЭЖХ-МС/МС

Мыльников П. Ю., Транова Ю., Шулькин А. В., Якушева Е. Н.

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Рязань, Россия

Аннотация. Актуальность. BCRP – эффлюксный белок-транспортёр, играющий важную роль в фармакокинетике широкого спектра лекарственных веществ. Активность BCRP в опытах *in vitro* оценивается по транспорту субстратов белка-транспортёра (метотрексата и др.) через билипидную мембрану клеток, гиперэкспрессирующих BCRP, например, клетках линии Сасо-2. Цель: разработать и валидировать методику количественного определения субстрата BCRP – метотрексата в транспортной среде клеток линии Сасо-2 методом ВЭЖХ-МС/МС. Методы исследования. Работа выполнена на ВЭЖХ-хроматографе «Ultimate 3000» («ThermoFisher», США) с тандемным масс-селективным детектором TSQ Fortis («ThermoFisher», США). Условия хроматографического анализа были следующими: колонка UCT Selectra C18 4,6 mm × 100 mm 5um, 100A, предколонка Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM, температура разделения – 35 °C, скорость потока – 0,3 мл/мин, объём вводимой пробы – 2 мкл, время анализа – 10 мин. Использовали градиентный режим элюирования: соотношение раствора 0,1 % муравьиной кислоты и ацетонитрила составило на 0 мин 75 и 25 %; 0,4 мин – 60 и 40 %; 6 мин – 20 и 80 %; 8 мин – 75 и 25 %. В данных условиях время удерживания метотрексата – 3,11 мин. Условия детектирования: метотрексат – положительный режим ионизации, 455,15 m/z → 308,125 m/z, энергия столкновения – 22,99 В, фрагментация источника – 5, давление CID-газа – 2 мТорр. Извлечение метотрексата из транспортной среды (раствор Хэнкса с 25 мМ Хепес и 1 % диметилсульфоксида) после инкубирования с клетками линии Сасо-2 в течение 3 ч осуществляли смесью метанол+вода в соотношении 1:1. Результаты. Разработанная методика была валидирована по следующим параметрам: селективность, линейность, точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность образцов. Подтверждённый аналитический диапазон методики составил 60–10 000 нмоль/л в транспортной среде. Выводы: разработана и валидирована методика количественного определения метотрексата в транспортной среде клеток линии Сасо-2 методом ВЭЖХ-МС/МС.

Ключевые слова: метотрексат; ВЭЖХ-МС/МС; клетки линии Сасо-2; BCRP

Для цитирования:

Мыльников П.Ю., Транова Ю., Шулькин А.В., Якушева Е.Н. Разработка и валидация методики количественного определения метотрексата в транспортной среде методом ВЭЖХ-МС/МС. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(1):45–51. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-1-45-51>

Поступила: 01 ноября 2020 г. **Принята:** 15 ноября 2020 г. **Опубликована:** 20 февраля 2021 г

Development and validation of the method for the quantitative determination of methotrexate in a transport medium by HPLC-MS/MS

Mylnikov PYu, Tranova Yu, Shchulkin AV, Yakusheva EN

FSBEI HE "I.P. Pavlov Ryazan State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ryazan, Russia

Abstract. Relevance. BCRP is an efflux transporter protein that plays an important role in the pharmacokinetics of a wide range of drugs. The BCRP activity *in vitro* experiments is assessed by the transport of transporter protein substrates (methotrexate, etc.) across the bilipid membrane of cells overexpressing BCRP, for example, Caco-2 cells. The aim is to develop and validate a method for the quantitative determination of the BCRP substrate, methotrexate, in the transport medium of Caco-2 cells by HPLC-MS/MS. Methods. The work was performed on an Ultimate 3000 HPLC chromatograph (ThermoFisher, USA) with a TSQ Fortis tandem mass-selective detector (ThermoFisher, USA). The conditions of chromatographic analysis were as follows: column UCT Selectra C18 4.6 mm * 100 mm 5um, 100A, Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM, separation temperature 35 °C, flow rate 0.3 ml/min, injected sample volume - 2 µl, analysis time - 10 min. Used a gradient elution: the ratio of the solution of 0.1 % formic acid and acetonitrile was at 0 min 75 and 25 %; 0.4 min 60 and 40 %; 6 minutes 20 and 80 %; 8 minutes 75 and 25 %. Under these conditions, the retention time of methotrexate is 3.11 minutes. Detection conditions: methotrexate - positive ionization mode, 455.15 m / z → 308.125 m / z, collision energy 22.99 V, source fragmentation 5, CID gas pressure 2 mTorr. The extraction of methotrexate from the transport medium (Hanks solution with 25 mM Hepes and 1% dimethyl sulfoxide) after incubation with Caco-2 cells for 3 h was carried out with a mixture of methanol + water in a ratio of 1: 1. Results. The developed method was validated according to the following parameters: selectivity, linearity, accuracy, precision, limit of quantitative determination, sample transfer, sample stability. The confirmed analytical range of the method was 60 -10,000 nmol / L in the transport medium. Conclusions: a method for the quantitative determination of methotrexate in the transport medium of Caco-2 cells by HPLC-MS / MS was developed and validated.

Keywords: methotrexate; HPLC-MS/MS; Caco-2 cells; BCRP

For citations:

Mylnikov PYu, Tranova Yu, Shchulkin AV, Yakusheva EN. Development and validation of the method for the quantitative determination of methotrexate in a transport medium by HPLC-MS/MS. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2021;(1):45–51. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-1-45-51>

Received: November 01, 2020. **Accepted:** November 15, 2020. **Published online:** February 20, 2021

Введение / Introduction

Белок устойчивости к раку молочной железы (BCRP, ABCG2) является одним из важнейших представителей суперсемейства ABC-транспортёров, который участвует в эффлюксе ксенобиотиков. BCRP был первоначально обнаружен в 1998 году в клетках рака молочной железы, обладающих множественной лекарственной устойчивостью [1]. В дальнейшем было показано, что BCRP экспрессируется в синцитиотрофобластах плаценты, на апикальной мембране эпителия тонкой кишки, на билиарной мембране гепатоцитов, в мембране эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга человека [2, 3]. Такая локализация данного белка-транспортёра в тканях организма указывает на то, что BCRP, помимо участия в развитии резистентности опухолей к химиотерапии, также играет важную роль в фармакокинетике — абсорбции, распределении и удалении лекарственных веществ, являющихся его субстратами.

BCRP имеет широкий спектр субстратов, который постоянно увеличивается с момента его открытия. К ним относят: митоксантрон, топотекан, метотрексат, нитрофурантоин, празозин, глибурид, циметидин, флавоноиды, порфирины, эстрон-3-сульфат (E1S) и др. [4, 5].

Учитывая вышеизложенное, для повышения безопасности терапии в США и Европе рекомендуется все новые лекарственные препараты тестировать на принадлежность к субстратам и ингибиторам BCRP. При этом первоначально исследования проводят на клетках, гиперэкспрессирующих данный белок-транспортёр, а затем при положительных результатах *in vitro* — на добровольцах [5].

Согласно рекомендациям FDA, в качестве тест системы *in vitro* могут использоваться клетки линии Caco-2 (аденокарциномы ободочной кишки человека) [6], а в качестве субстрата BCRP рекомендуется метотрексат [5].

Поэтому целью настоящего исследования явилась разработка и валидация методики количественного определения метотрексата в транспортной среде для клеток линии Caco-2 методом ВЭЖХ-МС/МС.

Материалы и методы / Material and methods

Использованные реактивы и оборудование / Reagents and equipment used

В исследовании использовали субстанцию метотрексата («Sigma Aldrich», Германия). Структурная формула метотрексата представлена на рис. 1.

Для выполнения ВЭЖХ использовали следующие реактивы: Вода ВЭЖХ-МС («Panreac», Испания), кислота муравьиная 98 % для аналитики («Panreac», Испания), ацетонитрил для UV-IR-HPLC («Panreac», Испания), метанол для HPLC («Merck», Германия).

Работа выполнена на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Ultimate 3000» («ThermoFisher», США), оснащённом градиентным насосом, дегазатором, автосамплером, УФ-детектором и tandemным масс-селективным детектором TSQ Fortis («ThermoFisher», США).

Управление совмещённой системой ВЭЖХ-МС/МС и обработку данных проводили при помощи программного обеспечения «Thermo Scientific Xcalibur (ver. 4.2.47)».

Условия хроматографического анализа были следующими.

Колонка UCT Selectra C18 4,6 mm×100 mm 5 um, 100A, предколонка Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM, температура разделения — 35 °C. Скорость потока — 0,3 мл/мин.

Использовали градиентный режим элюирования по следующей программе (табл. 1).

Ионизацию молекул проводили в режиме положительной ионизации на электроспрее при атмосферном давлении.

Режим детектирования: sheath gas (оболочечный газ) — 35 л/мин, aux gas (вспомогательный газ) — 7 л/мин, sweep gas (продувочный газ) 0 л/мин, температура трубки для переноса ионов — 300 °C, температура испарителя — 350 °C.

Условия детектирования: метотрексат — положительный режим ионизации, 455,15 m/z → 308,125 m/z, энергия столкновения — 22,99 В, фрагментация источника — 5, CID gas — 2 mTorr.

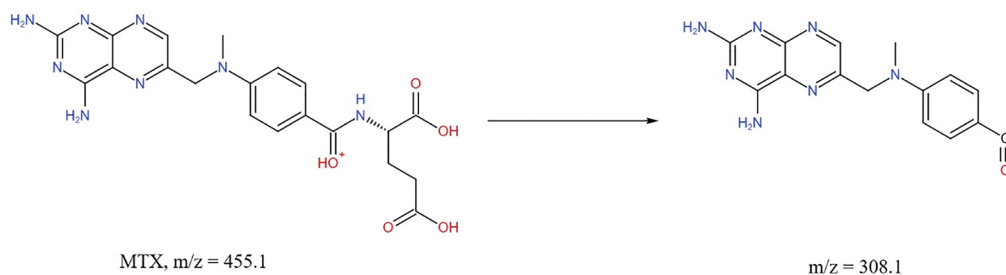


Рис. 1. Структурная формула метотрексата и основного продукта его фрагментации
Figure 1. Structure of methotrexate and the main product of its fragmentation

Таблица 1

Соотношение компонентов подвижной фазы в зависимости от времени, прошедшего с начала хроматографического анализа

Table 1

The ratio of the components of the mobile phase depending on the time elapsed since the beginning of the chromatographic analysis

Время / Time	Раствор муравьиной кислоты 0,1 % / Solution formic acid 0.1 %	Ацетонитрил / Acetonitrile
0,0 мин	75 %	25 %
0,4 мин	60 %	40 %
6,0 мин	20 %	80 %
8,0 мин	75 %	25 %

Скорость потока: 0,3 мл/мин, объём вводимой пробы составил 2 мкл.

Время анализа — 10 мин.

В данных условиях время удерживания метотрекса-та составило 3,11 мин.

Пробоподготовка / Sample Preparation

В качестве матрицы использовали транспортную среду, представляющую собой раствор Хэнкса («Sigma-Aldrich», Германия) с 25 мМ Хепес («Sigma-Aldrich», Германия) и 1 % диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия), после инкубирования с клетками линии Сасо-2 в течение 3 ч. Образцы матрицы замораживали и хранили при -80 °С до анализа.

Извлечение метотрекса-та из транспортной среды осуществляли смесью метанол+вода в соотношении 1:1. Для этого к 50 мкл образца транспортной среды добавляли 950 мкл смеси метанол : вода, тщательно перемешивали на встряхивателе Vortex (Heidolph, Германия), после чего центрифугировали в течение 10 мин при скорости 13000 g на центрифуге Avanti JXN-3 Beckman Coulter («Beckman Coulter», США). Надосадочную жидкость переносили в вials объёмом 1 мл и помещали в автосамплер.

Приготовление сток-раствора (матричного раствора) и калибровочных растворов / Preparation of stock solution (matrix solution) and calibration solutions

2,3 мг метотрекса-та растворяли в 5 мл метанола для получения раствора 0,46 мг/мл или 10^{-6} моль/мл или 1 нмоль/л, а затем к 1 мл полученного раствора добавляли 9 мл смеси вода : метанол (1:1) для получения раствора 100 нмоль/л. Из него готовили калибровочные растворы. Матричный раствор хранили при температуре -20 °С.

В работе использовали следующие калибровочные стандарты: 60, 100, 200, 600, 1000, 2000 и 10 000 нмоль/л.

Калибровочные стандарты для валидации были приготовлены путём последовательного разбавления матричного раствора транспортной средой. Диапазон концентраций метотрекса-та выбирался ис-

ходя из концентраций, ожидаемых в исследовании на клетках линии Сасо-2. Концентрации целевых соединений в анализируемых пробах определяли методом абсолютной калибровки.

Валидация / Validation

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе Руководства по экспертизе лекарственных средств, том I, правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, 2016, а также Руководств FDA Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evolution and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2018 и EMA Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2011 по следующим параметрам [7–10]:

- селективность;
- калибровочная кривая (линейность);
- нижний предел количественного определения;
- точность (на уровнях внутри цикла, между циклов);
- прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклов);
- перенос пробы;
- стабильность образцов.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Селективность. Проводили анализ холостой пробы транспортной среды без добавления стандарта метотрекса-та и образцов транспортной среды с добавлением метотрекса-та до конечных концентраций 60–10000 нмоль/л. На хроматограммах образцов холостой транспортной среды не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания метотрекса-та (рис. 2, 3).

Предел обнаружения метотрекса-та в транспортной среде при помощи используемой аналитической методики составил 20 нмоль/л, при этом соотношение сигнала к шуму (базовой линии) было не менее 3.

Нижний предел количественного определения метотрекса-та составил 60 нмоль/л. При этом отношение сигнала к шуму было не ниже 10, а точность и прецизионность определения не превышали 20 %.

Калибровочная кривая. Проводили анализ 7 образцов холостой транспортной среды с добавлением матричного раствора метотрекса-та до получения концентраций — 60, 100, 200, 600, 1000, 2000, 10 000 нмоль/л. По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах зависимость площадь пика метотрекса-та от концентрации метотрекса-та. Были получены следующие уравнения линейной регрессии: $y = 276,898 + 31,4557 \cdot x$,

$R^2 = 0,9993$, $W = 1/x$; $y = -2,62086 + 31,1129 \cdot x$,
 $R^2 = 0,9991$, $W = 1/x$; $y = -98,8244 + 31,5429 \cdot x$,
 $R^2 = 0,9989$, $W = 1/x$. Рассчитанные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений приведены в табл. 2.

Точность и прецизионность. Выполняли анализ образцов транспортной среды с добавлением стандартных растворов метотрексата до получения концентраций 60, 200, 4800 и 8000 нмоль/л. Анализ выполняли в рамках трёх циклов. В первом цикле оценивали прецизионность и точность внутри цикла, для этого анализировали по 5 образцов для каждой концентрации метотрексата. Во втором и третьем цикле тестировали прецизионность и точность между циклами. Полученные величины прецизионности (относительного

стандартного отклонения) и точности (относительной погрешности) соответствовали принятым нормам (не более 20 % для нижнего предела количественного определения и не более 15 % – для остальных точек) (табл. 3, 4).

Стабильность. Для оценки стабильности метотрексата в транспортной среде при хранении в замороженном состоянии готовили образцы с концентрацией метотрексата 60, 200, 4800 и 8000 нмоль/л. Половину образцов анализировали сразу после приготовления, а остальные – после хранения в замороженном состоянии (при -80°C) в течение 60 дней. Исследовали по 3 независимых образца. Рассчитанные концентрации метотрексата до и после заморозки статистически значимо не различались.

Перенос пробы. При последовательном анализе пробы с концентрацией метотрексата 10 000 нмоль/л

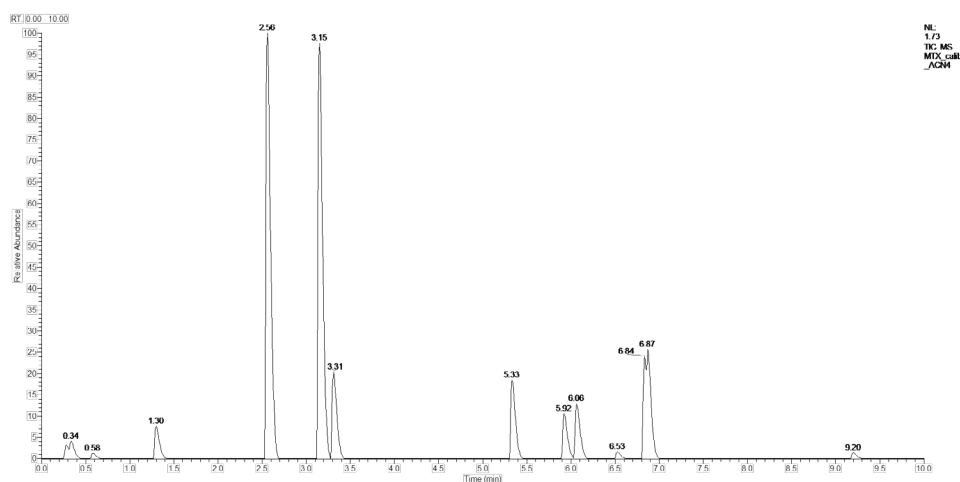


Рис. 2. Хромотограмма холостой транспортной среды
Figure 2. Chromatogram of the blank transport medium

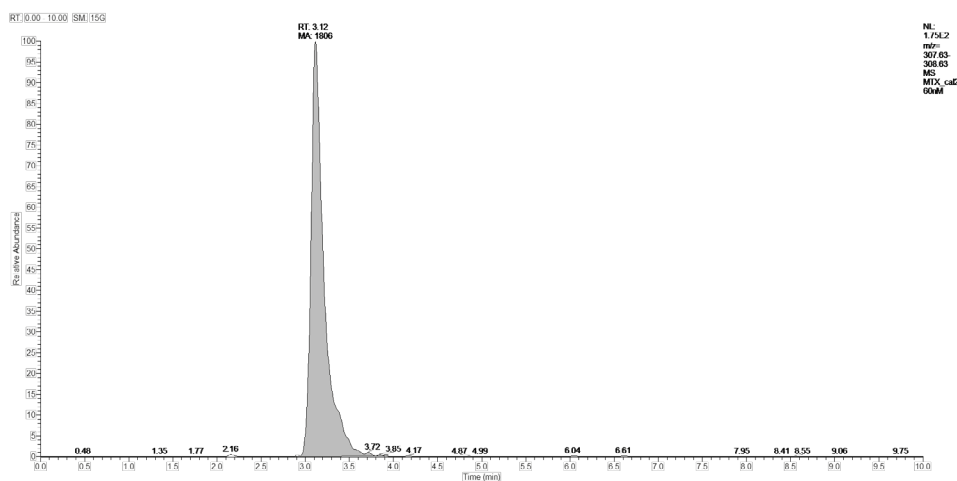


Рис. 3. Хромотограмма холостой транспортной среды с добавлением стандарта метотрексата до конечной концентрации 60 нмоль/л
Figure 3. Chromatogram of a blank transport medium with the addition of a methotrexate standard to a final concentration of 60 nmol/L

Таблица 2

Отклонения концентраций метотрексата в калибровочных образцах от их номинальных значений

Table 2

Deviations of methotrexate concentrations in calibration samples from their nominal values

Концентрация номинальная, нмоль/л / Nominal concentration, nmol/l	График 1		График 2		График 3	
	Концентрация рассчитанная, нмоль/л / Calculated concentration, nmol/l	Точность / Accuracy	Концентрация рассчитанная, нмоль/л / Calculated concentration, nmol/l	Точность / Accuracy	Концентрация рассчитанная, нмоль/л / Calculated concentration, nmol/l	Точность / Accuracy
60,0	59,8	0,36	70,4	17,3	65,9	9,8
100,0	100,1	0,12	96,8	3,19	102,9	2,9
200,0	191,4	4,3	193,7	3,16	184,1	7,96
600,0	658,0	9,7	572,1	4,7	626,8	4,47
1000,0	948,7	5,1	968,4	3,16	947,9	5,2
2000,0	1999,9	0,01	1907,9	4,6	1891,1	5,4
10 000,0	10 002,1	0,02	10 150,7	1,5	10141,2	1,41

Таблица 3

Точность и прецизионность методики количественного определения метотрексата в транспортной среде внутри цикла

Table 3

Accuracy and precision of the method for quantitative determination of methotrexate in the transport medium within the cycle

Концентрация номинальная, нмоль/л / Nominal concentration, nmol/l	Концентрация рассчитанная, нмоль/л / Calculated concentration, nmol/l	Точность, % / Accuracy, %	Среднее, нмоль/л / Mean, nmol/l	Средняя точность, % / Mean accuracy, %	SD	Прецизионность, % / Precision, %
60,0	69,5	15,78	67,2	11,9	3,1	5,1
	63,6	6,1				
	71,1	18,5				
	65,2	8,7				
	66,4	10,7				
200,0	209,9	4,9	210,5	5,3	17,7	8,8
	211,9	5,9				
	222,3	11,1				
	181,6	9,2				
	227,0	13,5				
4800,0	5148,1	7,3	4990,2	3,9	121,9	2,5
	4937,3	2,9				
	4825,6	0,5				
	4982,1	3,8				
	5058,1	5,38				
8000,0	7806,3	2,4	7717,6	3,5	267,1	3,3
	7768,6	2,9				
	7266,2	9,17				
	7767,6	2,9				
	7979,5	0,26				

Таблица 4

Точность и прецизионность методики количественного определения метотрексата в транспортной среде между циклами

Table 4

Accuracy and Precision of Methotrexate Quantification Method in Transport Medium Between Cycles

Концентрация номинальная, нмоль/л / Nominal concentration, nmol/l	Концентрация рассчитанная, нмоль/л / Calculated concentration, nmol/l	Точность, % / Accuracy, %	Среднее, нмоль/л / Mean, nmol/l	Средняя точность, % / Mean accuracy, %	SD	Прецизионность, % / Precision, %
60,0	67,2	11,9	68,1	13,6	1,9	3,1
	66,9	11,5				
	70,3	17,3				
200,0	210,5	5,3	195,2	2,4	14,4	7,2
	181,9	9,02				
	193,1	3,47				
4800,0	4990,2	3,9	4877,5	1,6	97,6	2,0
	4818,2	0,38				
	4824,2	0,5				
8000,0	7717,6	3,5	7761,9	2,9	38,4	0,5
	7783,1	2,7				
	7785,2	2,68				

и образца чистой транспортной среды на хроматограмме чистой транспортной среды отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам метотрексата.

Заключение / Conclusion

Разработана и валидирована методика количественного определения метотрексата в транспортной среде клеток линии Сасо-2. Экстракция метотрексата выполнялась добавлением к пробе смеси метанола и воды в соотношении 1:1. Количественное определение проводилось методом ВЭЖХ-МС/МС. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, линейность, точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность образцов.

Подтверждённый аналитический диапазон методики составил 60–10 000 нмоль/л в транспортной среде. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для оценки концентрации метотрексата в транспортной среде при изучении влияния тестируемых веществ на активность белка-транспортера BCRP.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Участие авторов. Мыльников П.Ю. — разработка и валидация методики; Транова Ю. — культивирование клеток линии Сасо-2, работа с хроматографом; Шулькин А.В. — анализ полученных данных, написание статьи; Якушева Е.Н. — общее руководство работой, редактирование статьи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мыльников Павел Юрьевич
e-mail: dukeviperlr@gmail.com
ORCID ID: 0000-0001-7829-2494
SPIN-код: 8503-3082

ассистент кафедры фармакологии с курсом фармации факультета дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Россия

Mylnikov Pavel Yu.
e-mail: dukeviperlr@gmail.com
ORCID ID: 0000-0001-7829-2494
SPIN code: 8503-3082

assistant of the Department of Pharmacology with the course of Pharmacy of the Faculty of Additional Professional Education FSBEI HE RyazSMU MOH Russia, Ryazan, Russia

Транова Юлия

e-mail: yulyatran@gmail.com

ORCID ID: 0000-0001-5068-1201

очный аспирант кафедры фармакологии
с курсом фармации факультета
дополнительного профессионального
образования ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава
России, Рязань, Россия

Tranova Julia

e-mail: yulyatran@gmail.com

ORCID ID: 0000-0001-5068-1201

full-time postgraduate student of the Department
of Pharmacology with the course of Pharmacy of
the Faculty of Additional Professional Education
FSBEI HE RyazSMU MOH Russia, Ryazan, Russia

Шулькин Алексей Владимирович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

ORCID ID: 0000-0003-1688-0017

SPIN-код: 2754-1702

д. м. н., профессор, доцент кафедры
фармакологии с курсом фармации факультета
дополнительного профессионального
образования ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава
России, Рязань, Россия

Shchulkin Alexey V.

Corresponding author

e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

ORCID ID: 0000-0003-1688-0017

SPIN code: 2754-1702

Dr. Sci. (Med.), Professor, associate Professor of
the Department of Pharmacology with the course
of Pharmacy of the Faculty of Additional Profes-
sional Education FSBEI HE RyazSMU MOH
Russia, Ryazan, Russia

Якушева Елена Николаевна

e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

ORCID ID: 0000-0001-6887-4888

SPIN-код: 2865-3080

д. м. н., профессор, зав. кафедрой
фармакологии с курсом фармации факультета
дополнительного профессионального
образования ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава
России, Рязань, Россия

Yakusheva Elena N.

e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

ORCID ID: 0000-0001-6887-4888

SPIN code: 2865-3080

Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Depart-
ment of Pharmacology with the course of Phar-
macy of the Faculty of Additional Professional
Education FSBEI HE RyazSMU MOH Russia,
Ryazan, Russia

Литература / References

1. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(26):15665–15670. DOI: 10.1073/pnas.95.26.15665.
2. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF et al. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res*. 2001;61(8):3458–3464.
3. Scheffer GL, Schepers RJ. Drug resistance molecules: lessons from oncology. *Novartis Found Symp*. 2002;243:19–31.
4. Chen ZS, Robey RW, Belinsky MG et al. Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Res*. 2003;63(14):4048–4054.
5. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations, 2012, 75 P.
6. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *In Vitro*

Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry, 2020, 43 P.

7. Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. — М.: Гриф и К; 2013. — 328 с. [Izuchenie bioekvivalentnosti vosproizvedennykh lekarstvennykh sredstv. Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennykh sredstv. Tom I. Moscow: Grif i K; 2013. (In Russ).]

8. Руководства по экспертизе лекарственных средств Том I, правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, Совет Евразийской экономической комиссии, решение от 3 ноября 2016 №85. [Rukovodstva po ekspertize lekarstvennykh sredstv Tom I, pravil provedeniya issledovaniy bioekvivalentnosti lekarstvennykh preparatov v ramkakh Evraziiskogo ekonomicheskogo soyuza, Sovet Evraziiskoi ekonomicheskoi komissi, reshenie ot 3 noyabrya 2016 №85. (In Russ).]

9. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Bioanalytical method validation. U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2018, 41 P.

10. EMA Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2011, 23 P.